



The frequencies of genotypes and alleles, the value of observable (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, the Wright fixation index (F_{is}) and the effective number of alleles (n_e) were determined based on the results of the studies. Haplotype frequencies were determined by calculating the EM-algorithm using the EH+ program. Calculations of the standardized measure of deviation by linkage from the equilibrium state were made using the 2LD program. According to the results of the studies, polymorphism was revealed for both experimental loci in the cattle population of the Ukrainian Black-and-White dairy breed. At the CSN2 locus, the A1 allele frequency was 0.44; A2 – 0.56. At the CSN3 locus, the A allele frequency was 0.80; allele B – 0.20. The experimental cattle population was in a state of genetic equilibrium in accordance with both polymorphic loci. Based on the analysis of the haplotype frequencies distribution, haplotype CSN2A1-CSN3A was found to have the highest frequency (0,46), haplotype CSN2A2-CSN3B had the smallest (0,085). In the experimental cattle population of the Ukrainian Black-and-White dairy breed there is no deviation from the equilibrium state by linkage ($D' = 0.33$; which is significantly less than the critical value) between the identified allelic variants of the CSN2 and CSN3 loci. This indicates that the distribution of haplotype frequencies is the result of the particularities of the corresponding alleles frequency distribution.

Keywords: polymorphism, population, cows, allele, genotype, haplotype, linkage, marker.

DOI 10.32900/2312-8402-2022-128-104-118

УДК 57.08:636.082.4

ВПЛИВ РОЗЧИНІВ РІЗНОЇ ОСМОЛЯРНОСТІ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ 15-32-КЛІТИННИХ ЕМБРІОНІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Лісін В. І., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0002-5461-0918>

Хмельков В. М., с. н. с., <https://orcid.org/0000-0002-6185-9383>

Бугров О. Д., д. б. н., професор

Дібіров М. К., д. б. н., с. н. с.

Інститут тваринництва НААН

Отримано ілюстративний матеріал, що дозволяє наочно спостерігати дію розчинів різної тоничності на морфологію отриманих in vivo 5-денних докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів і 6-денних ранніх морул великої рогатої худоби в залежності від їх технологічного стану.

У ембріонів досліджуваних стадій розвитку були визначені середні значення і показники варіації наступних морфометричних параметрів: зовнішнього та внутрішнього діаметрів прозорої оболонки (zona pellucida (ZP)), товщини ZP, діаметру клітинної маси (KM) ембріона та діаметру окремих ембріональних клітин. Перелічені параметри визначалися у кожного з ембріонів послідовно в інтактному, денудованому і дебластомерізованому станах в ізотонічних (0,29 Осм), гіпертонічних (1,5 Осм) та гіпотонічних (0,2 Осм) умовах.

Маніпуляції з ембріонами були проведені таким чином, щоб при послідовному перенесенні по розчинах різної осмолярності можна було ідентифікувати динаміку зміни морфології і параметрів як кожного з ембріонів (в інтактному



стані та після денудації), так і кожної з окремих ембріональних клітин (після дебластомеризації ембріона).

Зменшення або збільшення розмірів КМ ембріонів досліджуваних стадій розвитку при послідовному перенесенні їх по розчинах з різною осмолярністю відбувалося зі збереженням приблизної пропорційності їх форми. Після часткового зневоднення в гіпертонії денудовані ембріони відновлювали свої розміри здебільшого не повною мірою відносно своїх вихідних розмірів в інтактному стані в розчинах відповідної осмолярності. Подібна осмотична поведінка спостерігалася і у окремих клітин дебластомеризованих ембріонів.

Представлені в статті експериментальні дані дозволяють прогнозувати поведінку ембріонів під час мікрomanipуляцій, визначати послідовність, техніку та умови проведення з ними операцій, а також види, форму та розміри необхідних для цього мікроінструментів.

Ключові слова: велика рогата худоба, морфометричні параметри ембріонів, докомпактизаційні 15-17-клітинні ембріони, ранні морули, інтактний, денудований та дебластомеризований стан, гіпертонічні, ізотонічні та гіпотонічні умови.

Для практики мікрomanipуляцій дуже важливо знати розміри певних параметрів об'єктів, з якими планується проведення операцій. Це необхідно для вибору техніки проведення мікрomanipуляцій, а також для визначення видів і розмірів необхідних для цього мікроінструментів. На теперішній час накопичено достатньо великий об'єм інформації що до розмірів яйцеклітин та ембріонів багатьох видів ссавців, у тому числі і великої рогатої худоби (ВРХ) [1], в звичайних для цих об'єктів ізотонічних умовах. Однак пошук можливостей використання в практиці мікрomanipуляцій неізотонічних розчинів з метою створення умов, які поліпшують проведення операцій з ембріональним матеріалом, потребує вичерпної інформації зокрема про зміну розмірів та форми об'єктів у розчинах різної осмолярності. Існують повідомлення про вплив маніпуляцій та розчинів різної осмолярності на виживаність, осмотичну поведінку та деякі інші біологічні властивості яйцеклітин та ембріонів. Показано, що ні проколювання прозорих оболонок (zona pellucida (ZP)), ні гіпертонічна обробка морул кролика 0,5 М та 1,0 М розчинами цукрози у середовищі Дюльбекко не подіяли негативно на їх розвиток до бластоцист [2]. При цьому об'єм зародків зменшувався відповідно до 37-39% та до 32-35% і відновлювався при поверненні в ізотонію (0,29 Осм) до 87-94% та до 81-90%. Також було отримано 39, 42 та 31% кроленят після пересадки реципієнтам 2-4-клітинних зародків, витриманих передчасно у 0,5 М розчині цукрози у середовищі Дюльбекко відповідно 0, 30 та 60 хвилин. Розвиток ембріонів, за результатами цієї ж роботи, суттєво погіршувався тільки тоді, коли вони видержувалися у 0,5 М та 1,0 М розчинах більше 60 хвилин, а у 1,5 М розчині цукрози у середовищі Дюльбекко більше 30 хвилин. В іншій роботі показано, що використання 0,5 М розчину цукрози у середовищі Дюльбекко для множинної ін'єкції спермій у перивітеліновий простір (ПВП) ооцитів кролів полегшує виконання цієї операції і не погіршує подальший розвиток прооперованих об'єктів до морул, а імітація операції шляхом проколу ін'єкційною мікропіпеткою ZP ооцитів в гіпертонічних умовах не привела до збільшення у них випадків партеногенезу [3]. Застосування 0,5 М розчину цукрози у середовищі Дюльбекко для поміщення у ПВП енуклеюваних ооцитів бластомерів від 8-клітинних та 16-клітинних ембріонів значно полегшувало і прискорювало цей етап ембріонального клонування у



кролів [4]. Також було продемонстровано, що обробка ооцитів ВРХ 0,3 М цукрози у середовищі Дюльбекко з 20% фетальної телячої сироватки полегшує визначення місця локалізації метафазних хромосом при нормальній світловій мікроскопії і, відповідно, підвищує ефективність енуклеації без завдання шкоди для потенціалу розвитку *in vitro* клонуваних шляхом переносу ядра ембріонів [5]. Вольюмометричні дослідження з зиготами та ембріонами миші показали, що пропорційне зменшення клітин в об'ємі відмічалось у середовищах, доведених до гіпертонії шляхом додавання цукрози або NaCl, з осмолярністю аж до 1,5 Осм [6]. Подальше збільшення осмолярності середовища до 3,1 Осм приводило тільки до обмеженого подальшого стиснення зигот (мінімальний об'єм, який спостерігався, складав 27% від початкового). Витримка ембріонів у 3,2 Осм середовищі, доповненому NaCl, протягом 10 хвилин не завадила їх подальшому розвитку до стадії вилупленої бластоцисти. Смертельним майже для всіх зародків виявився розчин з осмолярністю 4,0 Осм. Визначені також оптимальні концентрації непроникаючих речовин і для яйцеклітин і зародків ВРХ. Розчини таких концентрацій приводять до суттєвої зміни розміру об'єктів і разом з тим не викликають їх загибелі. Показано, що при поміщенні зародків у гіпертонічний 1,5 Осм розчин NaCl об'єм їх клітинної маси за рахунок виходу із клітин води зменшувався у 2,8 рази і 90% зародків після повернення їх в ізотонічне середовище і подальшому культивуванні зберегли життєздатність [7, 8]. Поміщення ж зародків до гіпотонічного 0,2 Осм розчину NaCl за рахунок надходження води усередину клітин приводило до збільшення їх об'єму в 1,4 рази, а після повернення в ізотонічне середовище і культивування їх життєздатність склала 89%. Приведені дані показують, що правильний вибір осмолярності середовища для проведення тієї чи іншої операції наряду з дотриманням певного часового режиму може значно полегшити виконання маніпуляцій та підвищити їх ефективність, що було продемонстровано на прикладі отримання агрегаційних химерних ембріонів ВРХ [9] та вилучення ооцитів і ембріонів із ZP [10]. Тому цей напрямок удосконалення методів мікроманіпуляцій в ембріології потрібно розвивати.

Однак осмотична поведінка та чутливість до тих чи інших маніпуляцій у яйцеклітин та ембріонів різних стадій розвитку може бути не однакою у зв'язку з відмінностями їх морфологічної побудови. Ці ж самі показники можуть суттєво відрізнятися і у одного й того ж об'єкта в одних і тих же умовах в залежності від стану, в якому він знаходиться (в інтактному, денудованому (тобто після виивільнення клітинної маси (КМ) із ZP) чи дебластомерізованому (тобто після розділення КМ ембріона на окремі бластомери (клітини)). Без достатньої кількості даних що до цього про об'єкти всіх стадій розвитку, з якими планується проведення операцій, неможливо скласти повну системну інформацію про яйцеклітини та ембріони певних видів тварин як про об'єкти мікроманіпуляцій. Виходячи із вище викладеного, для практики мікроманіпуляцій з яйцеклітинами та ембріонами ВРХ ранніх доімплантаційних стадій розвитку є актуальним визначення того, як змінюються візуальні морфологічні ознаки та морфометричні параметри цих об'єктів та їх окремих елементів у розчинах різної тонічності (а саме: в ізотонічному (0,29 Осм), гіпотонічному (0,2 Осм) та гіпертонічному (1,5 Осм)) і в залежності від стану, в якому вони знаходяться (а саме: в інтактному, після денудації та після дебластомерізації).

Тому **метою роботи** було визначення впливу розчинів різної осмолярності на морфологію та параметри 15-32-клітинних ембріонів ВРХ, отриманих *in vivo*, в залежності від їх технологічного стану.



Матеріали та методи досліджень. Об'єктами досліджень були свіжоотримані докомпактизаційні 15-17-клітинні ембріони 5-денного віку та ранні морули (стадія 16→32 клітин) 6-денного віку, вимиті з репродуктивного тракту оброблених на суперовуляцію корів-донорів відповідно на 5-й та 6-й день після штучного осіменіння (день приходу донора в стан статевої охоти і осіменіння вважали нульовим днем).

Морфометрію кожного ембріона проводили в різних технологічних станах (інтактному, після денудації та після дебластомерізації) і в умовах середовищ з різною осмолярністю. Для роботи з ембріональним матеріалом використовували ізотонічне (0,29 Осм) середовище Дюльбекко з 10% фетальної телячої сироватки, гіпотонічне (0,2 Осм) середовище Дюльбекко з 10% фетальної телячої сироватки та гіпертонічне середовище Дюльбекко з 10% фетальної телячої сироватки, доповнене NaCl до осмолярності 1,5 Осм. Всі маніпуляції з ембріонами проводилися при кімнатній температурі (20-24 °C).

Для отримання відеозображень об'єктів та проведення з ними необхідних для цього мікрomanipуляцій використовували електромеханічний та механічний мікрomanipулятори, пневматичні насоси, інвертований мікроскоп "AXIOVERT-35", відеокамеру ACE-320, відеомагнітофон "Panasonic", телевізор "Daewoo" та комп'ютер. Необхідні для проведення маніпуляцій мікроінструменти (скляні мікроголки, утримуючі та ін'єкційні мікропіпетки) виготовляли із стандартних скляних капілярів (скло - "Пірекс"; довжина - 180 мм; зовнішній діаметр - 1,5 мм; внутрішній діаметр - 1 мм) за допомогою мікрокузень МК-1 та МК-2, а також приладу для заточування мікроінструментів (виробництва НВО "Біоприбор", м. Пушино, Росія).

Відеозображення кожного з об'єктів в потрібних ракурсах отримували в такій послідовності: спочатку знімали інтактний ембріон в ізотонічному середовищі, потім в гіпотонічному, знову в ізотонічному і нарешті в гіпертонічному середовищі, де його по закінченні зйомки за допомогою мікроприсоски та мікроголки вивільняли із прозорої оболонки; після цієї операції денудований ембріон послідовно знімали в гіпертонії, ізотонії, гіпотонії і знову в ізотонії. Деякі (найкращі за якістю) денудовані ранні морули, а також зародки ранньої докомпактизаційної 15-17-клітинної стадії зразу ж після зйомки розділяли мікроголкою на окремі бластомери в умовах ізотонії або гіпотонії. По закінченні процедури дебластомерізації зародка отримані окремі бластомери послідовно знімали в гіпотонічному, ізотонічному, гіпертонічному та ізотонічному середовищах. Перенесення бластомерів із краплі з одним середовищем в краплю з іншим середовищем проводилося за допомогою ін'єкційної мікропіпетки в певному порядку так, щоб кожний із бластомерів, знятий в умовах різної тонічності, можна було потім ідентифікувати.

Відеозображення кожного із знятих ембріонів в усіх потрібних для роботи ракурсах відцифровували за допомогою певного програмного забезпечення і приводили до єдиного масштабу (1 мм відеозображення відповідає 5 мкм реального розміру об'єкта, тобто збільшення - $\times 200$). Потім за цими відеозображеннями за допомогою програми Adobe Photoshop 6 визначали величини морфометричних параметрів ембріонів у різному технологічному стані і в умовах різної тонічності. Масштабування та розрахунок справжніх значень всіх лінійних параметрів об'єктів за отриманими промірами їх відеозображень проводили з використанням коефіцієнта пропорційності, який визначали між величиною зовнішнього діаметра мікроприсоски або ін'єкційної мікропіпетки (відомих розмірів, які визначали під мікроскопом за допомогою окуляр-метра) та справжнім значенням цього параметра. Статистичну обробку і аналіз отриманих експериментальних даних проводи-



ли з застосуванням методів, викладених у відповідних посібниках з біометрії [11, 12]. Визначення середніх значень та показників варіації морфометричних параметрів ембріонів проводили за описовою статистикою за допомогою програми Microsoft Excel.

У досліджуваних ембріонів визначали наступні морфометричні параметри: зовнішній діаметр ZP , внутрішній діаметр ZP , товщину ZP (визначали як половину різниці між зовнішнім і внутрішнім діаметрами ZP), діаметр KM ембріона та діаметр окремих ембріональних клітин. Оскільки досліджувані об'єкти мають округлу але все ж таки в різному ступені відмінну від правильної кулі чи сфери форму, то всі перелічені діаметри визначалися як усереднені значення за відповідними найбільшим і найменшим промірами.

Результати досліджень. Проведено досліди з визначення впливу розчинів різної осмолярності на морфологію та параметри докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів та ранніх морул ВРХ, що мають у своєму складі від 16 до 32 клітин, залежно від їх технологічного стану.

Отримано відповідний ілюстративний матеріал та визначено перелічені вище параметри ембріонів досліджуваних стадій розвитку в умовах розчинів різної тонічності та в різному технологічному стані.

На рис. 1 і 2 представлені відповідно відеозображення прооперованих докомпактизаційного 16-клітинного ембріона та 24-клітинного ембріона, що знаходиться на початку процесу компактизаціяції. Ембріони були послідовно витримані і зняті (згідно нумерації на рис. 1 і 2) в ізотонічному (0,29 Осм), гіпертонічному (1,5 Осм) та гіпотонічному (0,2 Осм) середовищах в інтактному, денудованому і дебластомерізованому станах.

Таким чином (рис. 1 і 2) були прооперовані і витримані в розчинах різної тонічності 4 докомпактизаційних ембріони 5-денного віку, що мали у своєму складі від 15 до 17 клітин, і 3 ранніх морули 6-денного віку, що мали у своєму складі від 16 до 32 клітин. Із цих ембріонів процедурі дебластомерізаціяції були піддані 2 кращих за якістю докомпактизаційних 16-клітинних ембріони і 1 рання 24-клітинна морула. У кожного із досліджуваних ембріонів були проведені відповідні виміри і визначені усереднені показники перелічених вище морфометричних параметрів в умовах і станах, представлених на рис. 1 і 2 (у 2 докомпактизаційних ембріонів і 1 ранньої морули за всіма 9 позиціями, у 2 інших докомпактизаційних ембріонів і 2 ранніх морул тільки за першими 6 позиціями). Отримані дані були оброблені статистично. Середні значення і показники варіаціяції досліджуваних морфометричних параметрів взятої в дослід виборки докомпактизаційних 5-денних ембріонів представлені в табл. 1, а виборки ранніх морул 6-денного віку – в табл. 2.



Таблиця 1
Морфометричні параметри докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів ВРХ в умовах різної тонічності і в різних технологічних станах

Параметри об'єкта	Тонічність середовища														
	Гіпертонія (1,5 Осм)				Ізотонія (0,29 Осм)				Гіпотонія (0,2 Осм)						
	Стат. характеристики параметрів		Стат. характеристики параметрів		Стат. характеристики параметрів		Стат. характеристики параметрів		Стат. характеристики параметрів		Стат. характеристики параметрів				
	<i>M±m</i> , МКМ	<i>lim</i> <i>min</i> , МКМ	<i>max</i> , МКМ	σ , МКМ	<i>Cv</i> , МКМ	<i>M±m</i> , МКМ	<i>lim</i> <i>min</i> , МКМ	<i>max</i> , МКМ	σ , МКМ	<i>Cv</i> , %	<i>M±m</i> , МКМ	<i>lim</i> <i>min</i> , МКМ	<i>max</i> , МКМ	σ , МКМ	<i>Cv</i> , %
Зовн. Ø ZP (P≥0,999)	167,5 ±1,93	164,2	172,5	3,85	2,3	167,5 ±1,93	164,2	172,5	3,85	2,3	167,5 ±1,93	164,2	172,5	3,85	2,3
Внутр. Ø ZP (P≥0,999)	137,8 ±1,93	134,7	142,6	3,85	2,8	137,8 ±1,93	134,7	142,6	3,85	2,8	137,8 ±1,93	134,7	142,6	3,85	2,8
Товщина ZP (P≥0,999)	14,8 ±0,09	14,6	15	0,183	1,23	14,8 ±0,09	14,6	15	0,183	1,23	14,8 ±0,09	14,6	15	0,183	1,23
Ø КМ ембріона (P≥0,999)	інтакт-ного	106,6 ±3,13	101	113	6,263	5,874	102	113	7,392	5,68	131,9 ±4,54	122,5	141,3	9,088	6,888
	денудованого	106,6 ±3,13	101	113	6,263	5,874	118,5	121	1,768	1,476	121,3 ±0,75	120,5	122	1,061	0,875
Ø окр. клітин дебласт. ембріона (n=26; n=32; n=30)	31,04 ±1,36 ***	13	46	6,928	22,32	39,13 ±1,40 ***	17	54	7,911	20,22	41,82 ±1,55 ***	19,5	56	8,5	20,32

Примітки. *** вірогідно P≥0,999 ; n = 4 ембріони;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембріонів в ізо- і гіпертонії - P≥0,99;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембріонів в ізо- і гіпотонії - P≤0,61;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембріонів в ізо- і гіпотонії - P≥0,99;

Різниця між Ø КМ денуд. ембріонів в ізо- і гіпертонії - P≥0,99;

Різниця між Ø КМ денуд. ембріонів в ізо- і гіпотонії - P<0,82;

Різниця між Ø КМ денуд. ембріонів в ізо- і гіпертонії - P≥0,99;

Різниця між Ø КМ інтакт. і денуд. ембріонів в ізотонії - P≥0,95;

Різниця між Ø КМ інтакт. і денуд. ембріонів в гіпотонії - P≤0,90;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембр. в ізотонії і денуд. ембр. в гіпотонії - P≤0,90;

Різниця між Ø окр. ембріональних клітин в ізо- і гіпертонії - P≥0,999;

Різниця між Ø окр. ембріональних клітин в ізо- і гіпотонії - P≤0,75;

Різниця між Ø окр. ембріональних клітин в ізо- і гіпертонії - P≥0,999.

Морфометричні параметри ранніх морул ВРХ в умовах різної тоничності і в різних технологічних станах

Параметри об'єкта	Тоничність середовища													
	Гіпертонія (1,5 Осм)				Ізотонія (0,29 Осм)				Гіпотонія (0,2 Осм)					
	Стат. характеристики параметрів		lim		M±m, МКМ	σ ₃ МКМ	CV ₃ МКМ	CV ₃ %	Стат. характеристики параметрів		lim		M±m, МКМ	σ ₃ МКМ
M±m, МКМ	lim	min, МКМ	max, МКМ	min, МКМ					max, МКМ	min, МКМ	max, МКМ			
Зовн. Ø ZP (P≥0,999)	170,2 ±3,54	163,2	174,3	6,13	3,6	3,6	3,6	6,13	170,2 ±3,54	163,2	174,3	6,13	3,6	3,6
Внутр. Ø ZP (P≥0,999)	135,2 ±3,25	128,7	138,6	5,63	4,2	4,2	4,2	5,63	135,2 ±3,25	128,7	138,6	5,63	4,2	4,2
Товщина ZP (P≥0,999)	17,5 ±0,22	17,2	17,9	0,39	2,22	2,22	2,22	0,39	17,5 ±0,22	17,2	17,9	0,39	2,22	2,22
Ø КМ ембріона (P≥0,999)	інтакт- ного	95,7	94,5	1,34	1,4	1,4	3,9	4,82	124,5 ±2,78	121	130	4,82	3,9	4,5
	денудо- ваного	93,5 ±1,54	90,5	95,6	2,67	2,9	3,8	4,43	116,4 ±2,56	111,3	119	4,43	3,8	10,5
Ø окр. клітин дебласт. ембріона (n=13; n=15; n=10)	24,94 ±0,85 ***	18,75	29,75	3,066	12,29	12,29	11,68	3,544	30,35 ±0,92 ***	24,75	38	3,544	11,68	13,64

Примітки: n = 3 ембріони; * - P≥0,99; : *** - P≥0,999

Різниця між Ø КМ інтакт. ембріонів в ізо- і гіпертонії - P≥0,999;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембріонів в ізо- і гіпотонії - P<0,61;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембріонів в ізо- і гіпертонії - P≥0,95;

Різниця між Ø КМ денуд. ембріонів в ізо- і гіперт онії - P≥0,95;

Різниця між Ø КМ денуд. ембріонів в ізо- і гіпотонії - P≤0,75;

Різниця між Ø КМ денуд. ембріонів в гіпо- і гіпертонії - P≥0,95;

Різниця між Ø КМ інтакт. і денуд. ембріонів в гіпертонії - P≤0,90;

Різниця між Ø КМ інтакт. і денуд. ембріонів в ізотонії - P≤0,90;

Різниця між Ø КМ інтакт. і денуд. ембріонів в гіпотонії - P<0,90;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембр. в ізотонії і денуд. ембр. в гіпотонії - P<0,90;

Різниця між Ø КМ інтакт. ембр. в гіпотонії і денуд. ембр. в гіпотонії - P<0,90;

Різниця між Ø окр. ембріональних клітин в ізо- і гіпертонії - P≥0,999;

Різниця між Ø окр. ембріональних клітин в ізо- і гіпотонії - P≥0,99;

Різниця між Ø окр. ембріональних клітин в гіпо- і гіпертонії - P≥0,999.



Було констатовано, що поміщення інтактних докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів і ранніх морул в розчини з різною осмолярністю ніяк не вплинуло на параметри і видимі морфологічні ознаки їх ZP (рис. 1 і 2 (1-3)). Середні значення ($M \pm m$) зовнішнього і внутрішнього діаметрів, а також товщини ZP, визначені у 4 інтактних 15-17-клітинних ембріонів в умовах різної тоничності показали високу ступінь вірогідності ($P \geq 0,999$) і відповідно склали $167,5 \pm 1,93$ мкм, $137,8 \pm 1,93$ мкм і $14,8 \pm 0,09$ мкм (табл. 1). Перелічені параметри ZP у ембріонів даної виборки характеризувалися низькою варіабельністю. Різниця між найменшим і найбільшим ембріонами за зовнішнім ($164,2$ мкм і $172,5$ мкм) і внутрішнім ($134,7$ мкм і $142,6$ мкм) діаметрами ZP склала близько 8 мкм, а за товщиною ZP ($14,6$ мкм і 15 мкм) – $0,4$ мкм. Коефіцієнти варіації (C_v) цих параметрів відповідно склали $2,3\%$, $2,8\%$ і $1,23\%$. Середні значення ($M \pm m$) зовнішнього і внутрішнього діаметрів, а також товщини ZP, визначені у 3 інтактних ранніх морул в умовах різної тоничності суттєво не відрізнялися від таких у 15-17-клітинних ембріонів. Вони також показали високий рівень вірогідності ($P \geq 0,999$) і відповідно склали $170,2 \pm 3,54$ мкм, $135,8 \pm 3,25$ мкм та $17,5 \pm 0,22$ мкм (табл. 2). Перелічені параметри ZP у ембріонів цієї вибірки характеризувалися невисокою варіабельністю. Різниця між найменшим і найбільшим ембріонами за зовнішнім ($163,2$ і $174,3$ мкм) і внутрішнім ($128,7$ і $138,6$ мкм) діаметрами ZP склала відповідно близько 11 мкм і 10 мкм, а за товщиною ZP ($17,2$ мкм та $17,9$ мкм) – $0,7$ мкм. Коефіцієнти варіації (C_v) цих параметрів відповідно склали $3,6\%$, $4,2\%$ та $2,22\%$.

Що стосується видимих морфологічних змін КМ докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів і ранніх морул, що спостерігалися при послідовному поміщенні їх в розчини із заданою осмолярністю, то можна констатувати наступне. Не було виявлено видимих відмінностей в осмотичній поведінці КМ ембріонів даних стадій розвитку в залежності від наявності або відсутності у них ZP (рис. 1 і 2 (1-6)). Тобто, характер морфологічних змін КМ, обумовлених зміною осмолярності навколишнього середовища, був практично однаковим у ембріонів, як в інтактному стані, так і після денудації. Морфологічні зміни КМ, що спостерігалися у докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів та ранніх морул, зводилися до наступного. При перенесенні ембріона з ізотонічного ($0,29$ Осм) середовища в гіпотонічне ($0,2$ Осм) середовище спостерігалось набухання та округлення клітин, що входять до складу КМ, і, як наслідок цього, збільшення загального розміру КМ, яке, однак, візуально було ледь помітним. При поміщенні ембріона в гіпертонічне ($1,5$ Осм) середовище спостерігалось добре виражене стиснення як самої КМ, так і кожної клітини, що входить до її складу. Поверхня клітин внаслідок значного зменшення їх об'єму в гіпертонії набувала нерівної зморшкуватої форми, що супроводжувалось також зменшенням прозорості клітин внаслідок виходу з них води та ущільнення цитоплазми. При поверненні ембріонів в ізотонічні умови, як із гіпотонії, так і з гіпертонії, їх КМ за візуальною оцінкою відновлювала свої вихідні розміри та форму.



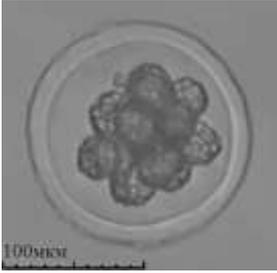
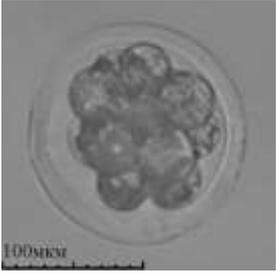
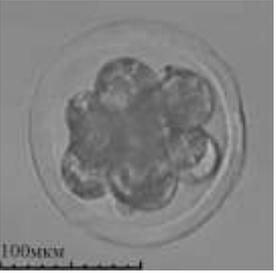
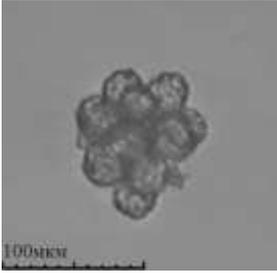
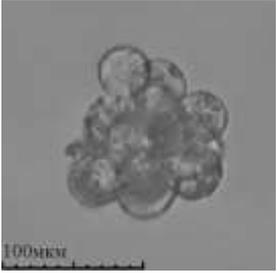
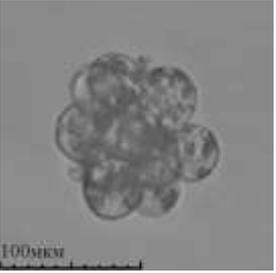
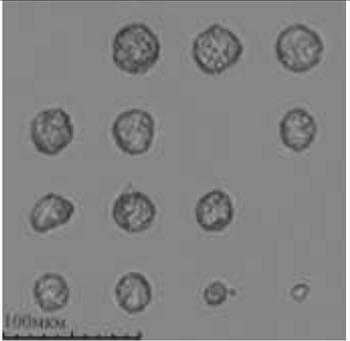
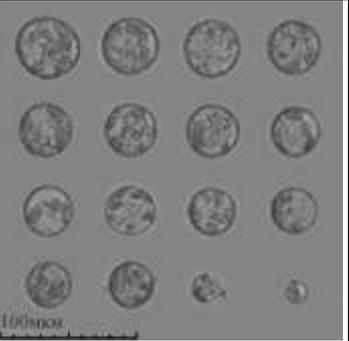
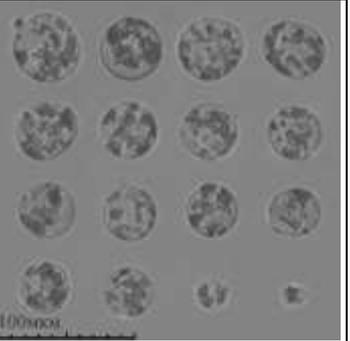
		Тонічність середовища		
		Гіпертонія (1,5 Осм)	Ізотонія (0,29 Осм)	Гіпотонія (0,2 Осм)
Технологічний стан ембріона	інтактний	 3	 1	 2
	після денудації	 4	 5	 6
	після дебластомерізації	 9	 8	 7

Рис. 1. Докомпактизаційний 16-клітинний ембріон ВРХ у різних технологічних станах та в умовах різної тонічності:

1-9 – нумерація послідовності отримання відеозображень прооперованого ембріона.

Зменшення або збільшення розмірів КМ 15-17-клітинних ембріонів та ранніх морул при перенесенні їх із розчину з однією осмолярністю в розчин з іншою осмолярністю відбувалося приблизно пропорційно їх формі (рис. 1 і 2 (1-6)).



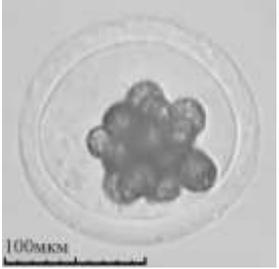
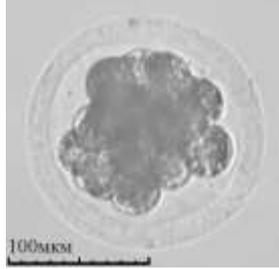
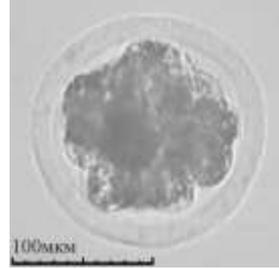
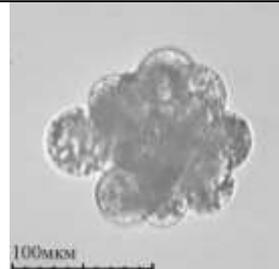
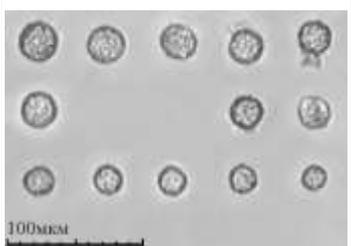
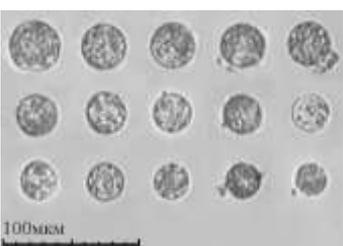
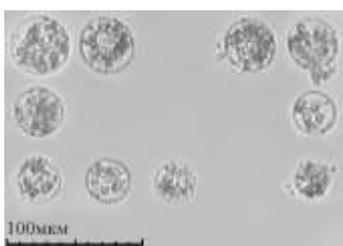
		Тонічність середовища		
		Гіпертонія (1,5 Осм)	Ізотонія (0,29 Осм)	Гіпотонія (0,2 Осм)
Технологічний стан ембріона	інтактний	 3	 1	 2
	після денудації	 4	 5	 6
	після дебластомерізації	 8	 7	 9

Рис. 2. 24-клітинний ембріон ВРХ (початок компактизації) у різних технологічних станах та в умовах різної тонічності:

1-9 – нумерація послідовності отримання відеозображень прооперованого ембріона.

Динаміка зміни параметрів КМ у докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів і у ранніх морул при послідовному поміщенні їх у розчини різної тонічності була багато в чому подібною, проте мала і деякі відмінності (рис. 1 і 2 (1-6) та табл. 1 і 2). Точні вимірювання параметрів КМ ембріонів цих стадій розвитку за їх відеозображеннями, отриманими послідовно в умовах різної тонічності, показали, що розміри КМ залежать не тільки від осмолярності того середовища, в яке ембріон поміщений, а й від осмолярності середовища, в якому він знаходився до цього. Слід також зазначити, що в більшості випадків помітити встановлені відмінності в параметрах КМ ембріонів візуально через мікроскоп було б досить важко (рис. 1 і 2 (1-6) та табл. 1 і 2). Так, вихідне середнє значення ($M \pm m$) діаметра КМ у інтактних 15-17-клітинних ембріонів в ізотонічному (0,29 Осм) середовищі склало $130,2 \pm 3,7$ мкм, а у інтактних ранніх морул – $124,5 \pm 2,78$ мкм. При перенесенні ембріонів цих стадій розвитку з ізотонічного в гіпотонічне (0,2 Осм) середовище



середнє значення діаметра їх КМ змінилося не достовірно ($P \leq 0,61$). У докомпактизаційних 15-17-клітинних ембріонів воно збільшилося всього на 1% і склало $131,9 \pm 4,54$ мкм, а у ранніх морул – на 3% і склало $128,6 \pm 3,35$ мкм. В умовах гіпертонічного (1,5 Осм) середовища середнє значення діаметра КМ інтактних 15-17-клітинних ембріонів зменшилося до $106,6 \pm 3,13$ мкм. Це становило 82% від їхнього початкового середнього значення в ізотонії і мало достовірну з ним різницю ($P \geq 0,99$). Середнє значення діаметра КМ ранніх інтактних морул в умовах гіпертонії (1,5 Осм) зменшилося до $95,7 \pm 0,78$ мкм. Це становило 77% від їхнього початкового середнього значення в ізотонії і мало з ним достовірну різницю ($P \geq 0,999$). Після денудації в гіпертонічному (1,5 Осм) середовищі середнє значення та показники варіації діаметра КМ цих же 15-17-клітинних ембріонів залишилися незмінними. Тобто, процес звільнення із ЗР в умовах гіпертонії тим способом, який ми використовували в даній роботі [10], практично не вплинув на розміри та морфологію КМ прооперованих 15-17-клітинних ембріонів. Середнє значення діаметра КМ ранніх морул після денудації в гіпертонічному (1,5 Осм) середовищі незначно зменшилося (приблизно на 2%, тобто до $93,5 \pm 1,54$ мкм), а показники варіації збільшилися приблизно в 2 рази. Однак ці зміни не мали достовірної різниці ($P \leq 0,61$) і були обумовлені очищенням КМ денудованих ембріонів від невеликої кількості мертвих клітин, що були відпочатку в їх складі. Після перенесення витриманих в гіпертонічному (1,5 Осм) середовищі денудованих 15-17-клітинних ембріонів в ізотонічне (0,29 Осм) середовище середнє значення діаметра їх КМ склало $119,8 \pm 1,25$ мкм. Ця величина відповідає приблизно 92% вихідної величини даного показника у інтактних ембріонів в ізотонії, має достовірну різницю ($P \geq 0,95$) і вказує на те, що після часткового зневоднення ембріонів в гіпертонії їх об'єм в ізотонічних умовах відновлюється не повною мірою. Після перенесення в ізотонічне (0,29 Осм) середовище витриманих у гіпертонічному (1,5 Осм) середовищі денудованих ранніх морул об'єм їх КМ також відновився не повною мірою. Це могло бути обумовлено частково осмотичним впливом, а частково очищенням КМ після денудації від залишків мертвих клітин. Середнє значення діаметра КМ ранніх денудованих морул в ізотонії склало $116,4 \pm 2,56$ мкм. Ця величина відповідає приблизно 93% вихідної величини даного показника у інтактних ембріонів в ізотонії, проте має з нею не достовірну різницю ($P \leq 0,90$). При подальшому перенесенні денудованих 15-17-клітинних ембріонів в гіпотонію середнє значення їх діаметра збільшилося до $121,3 \pm 0,75$ мкм, але все ж таки не досягло тієї величини, яка була у інтактних ембріонів в умовах ізотонії (93% від $130,2 \pm 3,7$ мкм) і тим більше гіпотонії (92% від $131,9 \pm 4,54$ мкм), і мало з ними не достовірну різницю ($P \leq 0,90$) (рис. 1 (1-6) і табл. 1). При перенесенні із ізотонії до гіпотонії денудованих ранніх морул середнє значення діаметра їх КМ збільшилося до $128,5 \pm 7,78$ мкм, і практично досягло тієї ж величини, яка була у них в гіпотонії в інтактному стані ($128,6 \pm 3,35$ мкм). Різниці між діаметрами КМ ранніх морул у гіпотонії та ізотонії в інтактному та денудованому станах також показали низький рівень достовірності ($P < 0,90$) (рис. 2 (1-6) і табл. 2).

2 кращих за якістю денудованих 16-клітинних ембріона і 1 з ранніх денудованих морул після експозиції в розчинах різної тонічності були розділені на окремі клітини. Дебластомерізація одного 16-клітинного ембріона була проведена в ізотонічному (0,29 Осм) середовищі, а другого – в гіпотонічному (0,2 Осм) середовищі. Від кожного 16-клітинного ембріона було отримано по 16 цілих клітин (збереженість склала 100%). Дебластомерізацію ранньої морули проводили в ізотонічному (0,29 Осм) середовищі. Початок формування щільних міжклітинних контактів на цій стадії ембріонального розвитку відчутно ускладнював процес по-



ділу ембріона на окремі бластомери та зумовлював неминучість механічного пошкодження певної їх кількості. З 24 клітин, що входили до складу прооперованої ранньої морули, одна клітина початково мала ознаки ушкодження та 8 клітин були пошкоджені в процесі дебластомеризації. В результаті було отримано 15 цілих окремих клітин (збереженість складала 62,5%). Клітини кожного з дебластомерізованих ембріонів у певних послідовностях були витримані та зняті на відео у розчинах різної тоничності. Всі клітини були ідентифіковані і за отриманими відеозображеннями було відстежено індивідуальний характер морфометричних змін кожної з клітин у розчинах різної осмолярності (рис. 1 (7-9) і рис. 2 (7-9)).

Середні значення ($M \pm m$) діаметра окремих клітин, визначені по кожному з досліджуваних 16-клітинних ембріонів в умовах середовищ з відповідними осмолярностями, не мали між собою достовірних відмінностей. Це дозволило нам об'єднати дані, отримані за цими двома ембріонами, в одну вибірку для більш об'єктивної оцінки впливу розчинів різної осмолярності на морфометричні параметри окремих клітин докомпактизаційних ембріонів 5-денного віку. Середні значення ($M \pm m$) діаметра окремих клітин 16-клітинних ембріонів, визначені в умовах різної тоничності, показали високий ступінь достовірності ($P \geq 0,999$) і склали: в ізотонічному (0,29 Осм) середовищі – $39,13 \pm 1,40$ мкм ($n=32$), у гіпотонічному (0,2 Осм) середовищі – $41,82 \pm 1,55$ мкм ($n=30$) та у гіпертонічному (1,5 Осм) середовищі – $31,04 \pm 1,36$ мкм ($n=26$) (табл. 1). Діаметри окремих ембріональних клітин в умовах ізотонії (0,29 Осм) та гіпертонії (1,5 Осм), а також гіпотонії (0,2 Осм) та гіпертонії (1,5 Осм) мають між собою достовірну різницю ($P \geq 0,999$). Різниця між діаметрами окремих ембріональних клітин в умовах ізотонії (0,29 Осм) і гіпотонії (0,2 Осм) була не значною і не достовірною ($P \leq 0,75$). При цьому клітини, що входили до складу досліджуваних 16-клітинних ембріонів досить сильно відрізнялися між собою за розміром (рис. 1 (7-9)). Так, найменша та найбільша клітини даної вибірки різнилися по діаметру в умовах ізотонії (0,29 Осм) майже в 3 рази (17 мкм і 54 мкм). Коефіцієнт варіації (Cv) цього параметра в ізотонії становив 20,22%. Приблизно така ж варіабельність клітин за діаметром мала місце в гіпотонії ($Cv=20,32\%$) і гіпертонії ($Cv=22,32\%$) (табл. 1).

Середні значення ($M \pm m$) діаметра уцілілих після дебластомеризації клітин 24-клітинної ранньої морули, визначені в умовах різної тоничності, показали високий ступінь достовірності ($P \geq 0,999$) і склали: в ізотонічному (0,29 Осм) середовищі – $30,35 \pm 0,92$ мкм ($n=15$), у гіпертонічному (1,5 Осм) середовищі – $24,94 \pm 0,85$ мкм ($n=13$) і в гіпотонічному (0,2 Осм) середовищі – $36,03 \pm 1,55$ мкм ($n=10$) (табл. 2). Діаметри окремих ембріональних клітин в умовах ізотонії (0,29 Осм) та гіпертонії (1,5 Осм), ізотонії (0,29 Осм) та гіпотонії (0,2 Осм), а також гіпотонії (0,2 Осм) та гіпертонії (1,5 Осм) мають між собою достовірні різниці (відповідно: $P \geq 0,999$; $P \geq 0,99$; $P \geq 0,999$). При цьому варіабельність за розміром у клітин, що залишилися цілими після дебластомеризації 24-клітинного ембріона (рис. 2 (7-9) і табл. 2), була майже в 2 рази менша, ніж у клітин дебластомерізованих 16-клітинних ембріонів (рис. 1 (7-9) і табл. 1). Так, найменша і найбільша клітини даної вибірки різнилися за діаметром в умовах ізотонії (0,29 Осм) приблизно в 1,5 рази (25 мкм і 38 мкм). Коефіцієнт варіації (Cv) цього параметра в ізотонії становив 11,68%. Приблизно така ж варіабельність клітин за діаметром мала місце в гіпотонії ($Cv=13,64\%$) і гіпертонії ($Cv=12,29\%$) (табл. 2).

Висновки:

1. Отримано ілюстративний матеріал, що дозволяє наочно спостерігати дію розчинів різної тоничності на морфологію докомпактизаційних 16-клітинних ембріонів та ранніх морул ВРХ в залежності від їхнього технологічного стану.



2. Визначено середні значення та показники варіації основних морфометричних параметрів ембріонів цих стадій розвитку послідовно в інтактному, денудованому та дебластомеризованому станах в ізотонічних (0,29 Осм), гіпертонічних (1,5 Осм) та гіпотонічних (0, 2 Осм) умовах.

3. На підставі отриманих морфометричних даних можна прогнозувати поведінку ембріонів під час маніпуляцій, визначати послідовність, техніку та умови проведення з ними операцій, а також види, форму та розміри необхідних для цього мікроінструментів.

Бібліографічний список

1. Кауффольд П., Тамм И., Шихов И. Я., Эриг Ф., Фальге Р., Роммель П. Оценка качества эмбрионов крупного рогатого скота: Руководство по пересадке эмбрионов. Москва: Агропромиздат, 1990. 56 с.: ил.

2. Yang X., Chen Y. Q., Chen J. B., Foote R. H. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: I. Survival of rabbit embryos in vitro and in vivo following sucrose treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 27. P.110-117.

3. Yang X., Chen J. B., Chen Y. Q., Foote R. H. Improved developmental potential of rabbit oocytes fertilized by sperm microinjection into perivitelline space enlarged by hypertonic media. *J. Exp. Zool.* 1990, 255(1). P.114-119.

4. Yang X., Zhang L., Kovaks A., Tobback C., Foote R. H. Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* 1990, 27. P. 118-129.

5. Liu J. L., Sung L. Y., Barber M., Yang X. Hypertonic Medium Treatment for Localization of Nuclear Material in Bovine Metaphase II Oocytes. *Biol. of Reprod.* 2002. 66(5). P. 1342-1349.

6. van Os H. C., Zeilmaker G. H. Volumetric behavior and survival of mouse zygotes and embryos in hyperosmotic media. *Hum. Reprod.* 1986. 1(2). P. 95-98.

7. А.с.1727822 1А СССР, МКИ А61D 19/04, С12Q 1/24. Способ проведения микрохирургических операций с яйцеклетками и эмбрионами/ Осташко Ф. И., Безуглый Н. Д., Гордиенко Н. А. (СССР). №4832540/15; Заявл. 12.04.1992; Опубл. 23.04.1992; Бюл.№ 15. 3 с.

8. Гордиенко Н. А., Безуглый Н. Д., Бондаренко А. И. Использование неизотонических растворов для проведения микрохирургических операций с яйцеклетками и эмбрионами млекопитающих. *Тезисы докладов Российско-Германского симпозиума "Успехи биотехнологии в размножении сельскохозяйственных животных"*. 1992.

9. Пат.17876А Україна, МКВ6 А61D 19/04 Спосіб отримання химерних ембріонів/ Безуглий М. Д., Гордієнко Н. О., Лісін В. І. (Україна). №96083085; Заявл. 01.08.1996; Опубл. 03.06.1997. Бюл. №5. 4 с.

10. Лисин В. И. Техника микрохирургической денудации яйцеклеток и эмбрионов млекопитающих. *Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва УААН*. Харків, 2006. № 94. С. 207-213.

11. Барановский Д. И., Любецкий М. Д., Прудников В. Г., Тищенко С. И. Методические рекомендации для самостоятельного изучения основ биометрии. Харьков, ХЗВИ, 1988. 87 с.

12. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. ВУЗов. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.



References

1. Kauffold, P., Tamm, I., Shihov, I. Ya., Erig, F., Falge, R., & Rommel, P. (1990). Ocenka kachestva embrionov krupnogo rogatogo skota: Rukovodstvo po peresadke embrionov [Assessing the Quality of Bovine Embryos: A Guide to Embryo Transfer]. Moskva : Agropromizdat, 56 [in Russian]
2. Yang, X., Chen, Y. Q., Chen, J. B., & Foote, R. H. (1990). Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: I. Survival of rabbit embryos in vitro and in vivo following sucrose treatment. *Mol. Reprod. Dev.* 27. 110-117.
3. Yang, X., Chen, J. B., Chen, Y. Q., & Foote, R. H. (1990). Improved developmental potential of rabbit oocytes fertilized by sperm microinjection into perivitelline space enlarged by hypertonic media. *J. Exp. Zool.* 255(1). 114-119.
4. Yang, X., Zhang, L., Kovaks, A., Tobback, C., & Foote, R. H. (1990). Potential of hypertonic medium treatment for embryo micromanipulation: II. Assessment of nuclear transplantation methodology, isolation, subzona insertion, and electrofusion of blastomeres to intact or functionally enucleated oocytes in rabbits. *Mol. Reprod. Dev.*, 27. 118-129.
5. Liu, J. L., Sung, L. Y., Barber, M., & Yang, X. (2002). Hypertonic Medium Treatment for Localization of Nuclear Material in Bovine Metaphase II Oocytes. *Biol. of Reprod.* 66(5). 1342-1349.
6. van Os, H. C., & Zeilmaker, G. H. (1986). Volumetric behavior and survival of mouse zygotes and embryos in hyperosmotic media. *Hum. Reprod.* 1(2). 95-98.
7. A.s.1727822 1A SSSR, MKI A61D 19/04, C12Q 1/24. Sposob provedenia mikrohirurgicheskikh operaciy s yaycekletkami i embrionami [Method for performing microsurgical operations with oocytes and embryos] Ostashko F. I., Bezugly N. D., Gordienko N. A. (SSSR). №4832540/15; Zayavl. 12.04.1992; Opubl. 23.04.1992; Bul.№ 15. 3 s. [in Russian]
8. Gordienko, N. A., Bezugly, N. D., & Bondarenko, A. I. (1992). Ispolzovanie neizotonicheskikh rastvorov dla provedenia mikrohirurgicheskikh operaciy s yaycekletkami i embrionami mlekopitayuschih [The use of non-isotonic solutions for microsurgical operations with mammalian oocytes and embryos]. *Tezisy dokladov Rossiysko-Germanskogo simpoziuma "Uspehi Biotekhnologii v razmnozhenii sel'skohoziaystvennykh zhivotnykh"* [in Russian]
9. Pat.17876A Ukraina, MKV6 A61D 19/04 Sposib otrymannia hymernykh embrioniv [The method of obtaining chimeric embryos] Bezugly M.D., Gordienko N.O., Lisin V.I. (Ukraina). № 96083085; Zayavl. 01.08.1996; Opubl. 03.06.1997. Bul. №5. 4 p. [in Ukrainian]
10. Lisin, V. I. (2006). Tehnika mikrohirurgicheskoy denudacii yaycekletok i embrionov mlekopitayuschih [The technique of microsurgical denudation of mammalian oocytes and embryos]. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu tvarynnyctva NAAN – Scientific and Technical Bulletin of the Institute of Animal Science of the National Academy of Agrarian Science of Ukraine.* Kharkiv, № 94. P. 207-213. [in Russian]
11. Baranovskiy, D. I., Lubeckiy, M. D., Prudnikov, V. G., & Tischenko, S. I. (1988). Metodicheskiye rekomendacii dla samostoyatel'nogo izucheniya osnov biometrii [Guidelines for self-study of the basics of biometrics]. Harkov, HZVI, 87 s. [in Russian]
12. Lakin, G. F. (1990). Biometria: Ucheb. posobiye dla biol. spec. VUZov [Biometrics: Textbook for Biological Specialties of Universities]. Moskva : Vysshaya shkola, 352 [in Russian]



INFLUENCE OF SOLUTIONS OF DIFFERENT OSMOLARITY ON MORPHOMETRIC PARAMETERS OF 15-32-CELLS BOVINE EMBRYOS

Lisin V. I., Khmelkov V. M., Bugrov O. D., Dibirov M. K., Institute of Animal Science NAAS

The illustrative material was obtained that allows to observe clearly the effect of different tonicity solutions on the morphology of bovine 5-days pre-compacted 15-17-cells embryos and 6-days early morulae obtained in vivo, depending on their technological state.

The average values and rates of variation of the following morphometric parameters were determined in embryos at the stages of the developmental study: outer and inner zona pellucida (ZP) diameters, ZP thickness, embryonic cell mass (CM) diameter and individual embryonic cell diameters. The mentioned parameters were determined in each of the embryos consistently in intact, denuded and deblastomerised states in isotonic (0.29 Osm), hypertonic (1.5 Osm) and hypotonic (0.2 Osm) conditions.

Manipulations with embryos were carried out in such a way that during consistent transfer through solutions of different osmolality, it was possible to identify the dynamics of changes in the morphology and parameters of each of the embryos (in the intact state and after denudation) and of each of the individual embryonic cells (after deblastomerisation of the embryo).

A decrease or increase in the size of the CM of embryos of the studied developmental stages during their successive transfer through solutions with different osmolality occurred with the preservation of the approximate proportionality of their shape. After partial dehydration in hypertonia, the denuded embryos recovered their sizes mostly not fully relative to their initial sizes in the intact state in solutions of the appropriate osmolality. Similar osmotic behavior was also observed in individual cells of deblastomerised embryos.

The experimental data presented in the article make it possible to predict the behavior of embryos during micromanipulations, to determine the sequence, technique and conditions of operations with them, as well as the types, shape and sizes of microtools necessary for this.

Key words: bovine; embryo morphometric parameters; pre-compacted 15-17-cells embryos; early morulae; intact, denuded and deblastomerised states; isotonic, hypertonic and hypotonic conditions.

DOI 10.32900/2312-8402-2022-128-118-130

УДК 636.4.082.453.5(477)

**ДОРОБОК ВЧЕНИХ ВІДДІЛУ БІОТЕХНОЛОГІЇ РЕПРОДУКЦІЇ
СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН ІНСТИТУТУ
ТВАРИННИЦТВА НААН У РОЗВИТОК ГАЛУЗІ
ВІДТВОРЕННЯ СВИНЕЙ
(ОГЛЯДОВА)**

Мартинюк І. М. к. с.-г. н., <https://orcid.org/0000-0002-3675-124X>

Інститут тваринництва НААН

Проаналізовано науковий внесок вчених лабораторії штучного осіменіння сільськогосподарських тварин Інституту тваринництва НААН (нині відділ біо-